

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年12月10日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500631

研究課題名（和文） トレーニング刺激としての活性酸素種の役割に関する運動生化学的研究

研究課題名（英文） Exercise biochemical study on the roles of reactive oxygen species as training stimuli

研究代表者

的場 秀樹 (MATOBA HIDEKI)

徳島大学・大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部・教授

研究者番号：20035166

研究成果の概要（和文）：

実験動物として雄性ラットを用い、高強度の間欠的な水泳トレーニングにより惹起される骨格筋の適応性変化に及ぼすビタミン C 投与の影響について検討した。得られた結果は、高強度の間欠的な水泳トレーニングによる骨格筋の CS 活性、PGC-1 α および Mn-SOD タンパク質量の増加はビタミン C 投与により妨げられないことを示した。次に、低強度の長時間水泳トレーニングによる糖代謝改善に及ぼすビタミン C 投与の影響について検討した。ここでも、低強度の長時間水泳トレーニングによる糖代謝改善はビタミン C 投与により抑制されないことが示された。

研究成果の概要（英文）：

In the present experiments conducted on rats, it was shown that vitamin C administration did not hinder the high intensity intermittent endurance training-induced increase in citrate synthase activity, PGC-1 α protein content and Mn-SOD protein content. It was also shown that vitamin C administration did not suppress the low intensity prolonged endurance training-induced improvement of insulin sensitivity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：身体運動，トレーニング効果，活性酸素，抗酸化物

1. 研究開始当初の背景

われわれ人間を含む生物の生命活動は、主に非常に効率の高いエネルギー獲得系である有酸素的代謝に依存しておこなわれている。有酸素的代謝では、主に栄養素として摂取し

た糖質および脂質は、水と二酸化酸素に代謝される。その際、大気中から体内に取り込まれた酸素は、ミトコンドリアで4電子還元されて水になる。酸素が水に還元される過程で、必然的にスーパーオキシドアニオン、過酸化

水素、ヒドロキシラジカルなどの活性酸素が生じる。さらに活性酸素は、激運動時に無酸素的代謝が高進する際や、異物の侵入時にも発生する。一方、発生する活性酸素に対処するため、生物は精巧な抗酸化システムを備えている(野口 2003)。しかし、発生源が何であれ、発生する活性酸素に抗酸化システムが対処しきれず、酸化ストレス状態に陥り、糖質、脂質、タンパク質、核酸などの生体構成要素に酸化損傷が生じることがある。このため、身体運動時のように代謝レベルが高まり活性酸素の発生が増加する場合には、活性酸素による酸化障害を予防するため、抗酸化物質の摂取が勧められている(伊藤 2001)。

確かに、自身の抗酸化能力を上回る活性酸素の発生があった場合には、活性酸素は生体構成要素に酸化損傷を生じさせる。しかし、近年、活性酸素は情報伝達物質として細胞内シグナリングの一翼を担い、遺伝子の発現制御を介して生体の環境適応に貢献することが指摘されている。たとえば、ラットに活性酸素/活性窒素産生を触媒するキサンチン・オキシダーゼの阻害剤であるアロプリノールを投与することにより、運動による Mn-SOD、iNOS、eNOS の誘導が抑えられること、およびこの誘導抑制は MAP キナーゼ経路の活性化抑制と NF- κ B の活性化を介することが報告されている(Gomez-Cabrera et al. 2005)。さらに、抗酸化物質であるビタミン C の投与は、抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)とグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)のトレーニングによる向上を阻むばかりでなく、持久性トレーニング効果をも著しく阻害することが示されている(Gomez-Cabrera et al. 2008)。また、ビタミン C 投与による持久性トレーニング効果の阻害は、ミトコンドリア新生に関与する転写因子の発現低下によることも報告されている(Gomez-Cabrera et al. 2008)。

これらの報告は、抗酸化物質の摂取は通常生体に抗酸化能力の向上をもたらすが、同時に活性酸素の細胞内シグナリングを抑えることにより生体にとって好ましい適応機制的成立を阻害する可能性があることを示唆する。特に、一過性運動、あるいは身体トレーニングは、それ自体、抗酸化能力を向上させるので、必要以上の抗酸化物質の摂取は好ましい適応機制的成立を阻害するだけの結果となる危険性すらある。

国民の健康志向の高まりを背景に、抗酸化物質の効用のみが喧伝される傾向が強い今日、特に身体トレーニングの実施時に抗酸化物質の摂取が必要か否か、さらに必要な場合

は適正な抗酸化物質の摂取量ほどの程度か、さらにどのような摂取方法が最適か、などに関して数多く存在する抗酸化物質の種類毎に明らかにすることは、運動実施者を活性酸素による損傷から守りつつ、最大限のトレーニング効果を確保するために是非とも必要である。

2. 研究の目的

上述の通り、抗酸化物質の摂取は通常生体に抗酸化能力の向上をもたらすが、同時に活性酸素の細胞内シグナリングを抑えることにより生体にとって好ましい適応機制的成立を阻害する可能性がある。そこで、一過性運動あるいは身体トレーニングの実施時に抗酸化物質の摂取が必要か、さらに必要な場合は適正な抗酸化物質の摂取量ほどの程度であるかに関しては、数多く存在する抗酸化物質の種類毎に明らかにする必要がある。

しかし、時間的な制限もあるので、本研究では抗酸化物質としてビタミン C を取り上げる。そして、第一実験において、持久性トレーニングによる骨格筋のミトコンドリア新生に及ぼすビタミン C 投与の影響を検討する。さらに第二実験において、持久性トレーニングによる糖代謝改善に及ぼすビタミン C 投与の影響を調べる。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験動物として雄性ラットを用いた。

(2) 持久性トレーニング

持久性トレーニングとして、低強度の長時間水泳トレーニング(low intensity prolonged swimming training)、あるいは高強度の間欠的な水泳トレーニング(high intensity intermittent swimming training)をラットに負荷した。低強度の長時間水泳トレーニングでは、ラットの尾部に重りを装着せず、1セット3時間の水泳を45分間の休息をはさんで1日に2セット行わせた。トレーニング期間は10日間であった。高強度の間欠的な水泳トレーニングでは、水泳時に体重の8~10%の重りを尾部に取り付け、20秒水泳、10秒休息を1セットとして、最終的には最大1日に12セット行わせた。トレーニングの頻度は週5日、トレーニング期間は4週間であった。

(3) ビタミン C 投与

水道水に溶解したアスコルビン酸をラットに投与した。投与は、飼育ケージに設置した給水ボトルよるか、あるいは実験動物用フィードリング・ニードルによった。

(4) 血漿、血清および組織の生化学的分析

① 血漿、血清の分析

市販の分析用キットを用いてグルコース（和光純薬）、トリグリセライド（和光純薬）、乳酸（Trinity Biotech）およびインスリン（Mercodia）濃度を測定した。

② 骨格筋の酵素活性の測定

滑車上筋（*m. epitrochlearis*）と上腕三頭筋（*m. triceps brachii*）のクエン酸合成酵素（CS）活性および乳酸脱水素酵素（LDH）活性を測定した。CS 活性の測定は Srere (1969) の方法に従った。LDH 活性は Green et al. (1984) の方法を用いて測定した。

③ Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator (PGC)-1 α 、Mn-SOD、Cu-Zn-SOD のタンパク質量の測定

PGC1 α 、Mn-SOD、Cu-Zn-SOD のタンパク質量はウェスタンブロット法により測定した。用いた一次抗体は、anti-PGC-1 (Millipore)、anti-Mn-SOD (Millipore) および anti-Cu-Zn-SOD (Millipore) であった。

④ 血中ビタミン C 濃度の測定

血中のビタミン C 濃度の測定は、Benzie and Strain (1999) の方法に従った。

⑤ 血中の酸化ストレスおよび抗酸化能の測定

酸化ストレス指標として活性酸素代謝物濃度（d-ROMs）を、抗酸化能力の指標として Ferric Reducing/Antioxidant Power (FRAP) を用いた。d-ROMs の測定は、Alberti et al. (2000) に基づいて行った。FRAP の測定は、Benzie and Strain (1999) の方法に従った。

⑥ グルコース代謝能の評価

糖負荷テスト時の血漿グルコース濃度およびインスリン濃度よりインスリン感受性指標およびインスリン抵抗性指標を算出し、評価した (Matsuda and DeFronzo 1999; Matthews et al. 1985)。

4. 研究成果

(1) 第一実験においては、高強度の間欠的な水泳トレーニングにより惹起される骨格筋の適応性変化に及ぼすビタミン C 投与の影響について検討を行うことを目的とした。

実験動物として Wistar 系雄性ラットを使用した。予備飼育後、ラットをコントロール (Control) 群、トレーニング (Training) 群、ビタミン C 少量投与トレーニング群、ビタミン C 中等度投与トレーニング群およびビタミン C 多量投与トレーニング群に分けた。ビタミン C 投与量は、体表面積当たりあるいは体重当たりで表した。高強度の間欠的な水泳トレーニングでは、ラットに体重の 8-10% の負荷を尾部に取り付け、20 秒水泳、10 秒休憩を 1 セットとした水泳運動を課した。セット数は 3 セットから始め、最大 12 セット行わせた。トレーニングは週 5 回で 4 週間行った。

トレーニング終了後、滑車上筋の citrate synthase (CS) および lactate dehydrogenase (LDH) 活性、PGC-1 α 、Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD) および Cu-Zn-SOD タンパク質量の測定を行った。また、一過性運動前後の血中活性酸素代謝物濃度（d-ROMs）、および Ferric Reducing/Antioxidant Power (FRAP) を測定した。加えて、トレーニング後の血中 FRAP も測定した。

その結果、CS 活性、PGC-1 α および Mn-SOD タンパク質量はトレーニングを行った全ての群でコントロール群と比較して有意な増加を認めた。一方、ビタミン C 投与は CS 活性、PGC-1 α および Mn-SOD タンパク質量に及ぼすトレーニング効果に影響を及ぼさなかった。LDH 活性および Cu-Zn-SOD タンパク質量はトレーニングにも、ビタミン C 投与にも影響を受けなかった。一過性運動後には、トレーニングを行った全ての群でコントロール群と比較して有意に高い d-ROMs 値を示した。さらに、ビタミン C 少量投与トレーニング群およびビタミン C 多量投与トレーニング群は、ビタミン C 非投与のトレーニング群よりも有意に高い d-ROMs 値を示した。FRAP はトレーニング群、ビタミン C 少量投与トレーニング群およびビタミン C 中等度投与トレーニング群がコントロール群と比較して有意に高値を示した。

以上の通り、高強度の間欠的な水泳トレーニングでは、骨格筋の CS 活性、PGC-1 α および Mn-SOD タンパク質量の増加といったトレーニングによる骨格筋の適応は、ビタミン C 投与では妨げられないことが示された。このような結果が得られた理由は明らかでない。しかし、一過性運動により血中の酸化ストレスは増加するが、ビタミン C 投与は運動による酸化ストレスの増加を軽減させず、むしろ増加させること、および一過性運動後の抗酸化能力の指標である FRAP は運動で増加したがビタミン C 投与による更なる増加は認められなかった。したがって、本研究の条件下ではビタミン C 投与が非酵素的抗酸化システムに大きな影響は与えなかったことが、骨格筋の適応が妨げられなかった要因の一つであると推論できる。

(2) 第二実験において、低強度の長時間水泳による持久性トレーニングによる糖代謝改善に及ぼすビタミン C 投与の影響について検討した。

4 週令の SD 系雄性ラットを使用し、ビタミン C 非投与トレーニング群、ビタミン C 投与トレーニング群、ビタミン C 投与コントロール群、ビタミン C 非投与コントロール群の 4 群に分けた。ビタミン C 投与を行った二群には 1 日体重 1kg 当たり 500mg のビタミン C を給水ボトルにより投与した。ビタミン C 非

投与トレーニング群およびビタミンC投与トレーニング群に対しては、1日に45分間の休憩をはさんだ3時間2セットの水泳トレーニングを10日間負荷した。水泳トレーニングが終了した時点で、全てのラットに対して腹腔内糖負荷テスト (intra-peritoneal glucose tolerance test (IPGTT)) を実施した。得られた血中グルコース濃度とインスリン濃度から耐糖能を示すAUC (Area under the curve)、インスリン感受性を示すISI (comp)、およびインスリン抵抗性を示すHOMA-Rを算出した。

得られた結果は以下の通りであった。すなわち、トレーニングは血中グルコース濃度及び血中インスリン濃度のAUCを有意に低下させた ($P < 0.05$)。しかし、ビタミンC投与は血中グルコース濃度及び血中インスリン濃度のAUCに有意な影響を及ぼさなかった。ISI (comp) で示されるインスリン感受性はトレーニングによって有意に高まった ($P < 0.05$) が、ビタミンC投与はISI (comp) の値に有意な影響を及ぼさなかった。HOMA-Rで示されるインスリン抵抗性に対しては、トレーニング、ビタミンC投与とも有意な影響を及ぼさなかった。

このように、第二実験では、持久性トレーニングによる糖代謝改善はビタミンC投与により抑制されないことが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計12件)

- ①的場秀樹、ビタミンC投与が長時間水泳トレーニングによる糖代謝改善に及ぼす影響、平成23年度四国体育スポーツ学会、2012. 3. 3、高知大学 (高知市)
- ②的場秀樹、ビタミンC投与がラットの間欠的水泳トレーニングにより生じる骨格筋の適応に及ぼす影響、平成23年度四国体育スポーツ学会、2012. 3. 3、高知大学 (高知市)
- ③的場秀樹、持久性トレーニングとビタミンC投与がラットの血中ビタミンC濃度に及ぼす影響、第66回日本体力医学会大会、2011. 9. 18、海峡メッセ下関 (下関市)
- ④的場秀樹、ビタミンC投与が持久性トレーニングによる骨格筋の適応に及ぼす影響、第19回日本運動生理学会大会、2011. 8. 25、徳島大学 (徳島市)
- ⑤的場秀樹、トレーニング時におけるビタミンC投与が血中の糖質・脂質代謝関連指標に及ぼす影響、第19回日本運動生理学会大会、2011. 8. 25、徳島大学 (徳島市)
- ⑥的場秀樹、大会長講演：身体トレーニング効果の発現メカニズムを探る、第19回日本運動生理学会大会、2011. 8. 25、徳島大学 (徳

島市)

- ⑦Matoba Hideki、Effect of Vitamin-C Supplementation on Endurance-training-induced Increase in Aerobic Capacity of Rat Skeletal Muscle、American College of Sports Medicine 58th Annual Meeting、2011. 6. 1、Denver (U.S.A.)
- ⑧的場秀樹、ラットの間欠的水泳トレーニングとビタミンC投与が骨格筋の酵素活性及び抗酸化酵素のタンパク質発現に及ぼす影響、平成22年度四国体育スポーツ学会、2011. 2. 12、徳島文理大学 (徳島市)
- ⑨的場秀樹、ビタミンC投与がラット骨格筋の持久性トレーニング効果に及ぼす影響、第66回日本体力医学会中国・四国地方会、2010. 11. 21、徳島大学 (徳島市)
- ⑩的場秀樹、ビタミンC投与が持久的トレーニング効果に及ぼす影響、第65回日本体力医学会大会、2010. 9. 17、千葉商科大学 (千葉市)
- ⑪的場秀樹、持久性トレーニング時のビタミンC投与が代謝酵素活性に及ぼす影響、第18回日本運動生理学会大会、2010. 7. 31、鹿児島大学 (鹿児島市)
- ⑫的場秀樹、水泳運動によるトレーニング効果に及ぼすビタミンC投与の影響、第64回日本体力医学会中国・四国地方会兼第29回運動生理学・バイオメカニクス中四国セミナー、2009. 11. 22、山口大学 (山口市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳島大学・大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部・教授

的場 秀樹 (MATOBA HIDEKI)

研究者番号：20035166